

- (19)【発行国】日本国特許庁（ＪＰ）  
 (12)【公報種別】公表特許公報（Ａ）  
 (11)【公表番号】特表２００３－５２７６０５（Ｐ２００３－５２７６０５Ａ）  
 (43)【公表日】平成１５年９月１６日（２００３． ９． １６）  
 (54)【発明の名称】生物学的物質マイクロアレイの作製および使用方法  
 (51)【国際特許分類第７版】

G01N 33/53

B01D 57/02  
 B03C 5/00  
 C12N 15/00  
 C12Q 1/68  
 G01N 21/78  
 27/447  
 33/543 575  
 37/00 102  
 // G01N 21/64

【Ｆ１】

G01N 33/53 M  
 D  
 U  
 B01D 57/02  
 B03C 5/00 Z  
 C12Q 1/68 A  
 G01N 21/78 C  
 33/543 575  
 37/00 102  
 21/64 G  
 27/26 315 Z  
 C12N 15/00 H  
 F

【審査請求】未請求

【予備審査請求】有

【全頁数】３６

- (21)【出願番号】特願２００１－５６８０７５（Ｐ２００１－５６８０７５）  
 (86)(22)【出願日】平成１３年３月６日（２００１． ３． ６）  
 (85)【翻訳文提出日】平成１４年９月１３日（２００２． ９． １３）  
 (86)【国際出願番号】ＰＣＴ／ＥＰ０１／０２５２０  
 (87)【国際公開番号】ＷＯ０１／０６９２４７  
 (87)【国際公開日】平成１３年９月２０日（２００１． ９． ２０）  
 (31)【優先権主張番号】０００６４２５． ３

(32)【優先日】平成12年3月17日(2000. 3. 17)

(33)【優先権主張国】イギリス(GB)

(81)【指定国】EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71)【出願人】

【氏名又は名称】バイオインヴェント インターナショナル アーベー

【住所又は居所】スウェーデン国 S-223 70 ルント(番地なし)

(72)【発明者】

【氏名】ローランド・カールソン

【住所又は居所】スウェーデン・S-226・54・ルント・ステナルデルスヴァーゲン・99

(72)【発明者】

【氏名】カール・アルネ・クリスター・ボレバエック

【住所又は居所】スウェーデン・S-245・62・ヒェールブ・アテファーゲン・8ペー

(74)【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】志賀 正武(外7名)

【テーマコード(参考)】

2G043  
2G054  
4B024  
4B063  
4D054

【Fターム(参考)】

2G043 AA01 DA02 EA01 GA07 GB21 LA01  
2G054 BB03 CA22 CA23 CE02  
4B024 AA11 CA09 HA12  
4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QR82 QS34 QX02  
4D054 FA06 FB20

## 要約

---

### (57) 【要約】

(i)複製可能なユニットの表面のリガンドとの結合に関して表示されるアンチリガンド分子のライブラリーを準備し、(ii)リガンドの混合物を準備し、(iii)ライブラリーを混合物に曝し、それにより、リガンド／アンチリガンド結合が生成することができ、(iv)リガンドと結合するアンチリガンドを単離してその数を増幅し、さらに(v)同じアンチリガンド、または複数の異なるアンチリガンドの調製物を基板の個別領域に適用して固相支持体上に個別のアンチリガンド含有領域のアレイを形成することを含む、選択されたアンチリガンドのアレイを作製する方法。

### 請求の範囲

---

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (i) 複製可能なユニットの表面のリガンドとの結合に関して表示されるアンチリガンド分子のライブラリーを準備し、(ii) リガンドの混合物を準備し、(iii) ライブラリーを混合物に曝し、それにより、リガンド／アンチリガンド結合が生成することができ、(iv) リガンドと結合するアンチリガンドを単離してその数を増幅し、さらに (v) 同じアンチリガンド、または複数の異なるアンチリガンドの調製物を基板の個別領域に適用して固相支持体上に個別のアンチリガンド含有領域のアレイを形成することを含む、選択されたアンチリガンドのアレイを作製する方法。

【請求項2】 工程(iii)と(iv)の間に複製可能なユニットの表面でアンチリガンドと結合したリガンドを単離する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 混合物中のリガンドが固定化される、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 リガンド混合物が、それがライブラリーに曝される前に1以上のパラメーターに基づいて分離される、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 リガンド混合物が二次元ゲル電気泳動を用いて分離される、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 分離された混合物中のリガンドが支持体表面に固定化される、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 支持体表面がニトロセルロースまたはポリニフッ化ビニリデン(PVDF)膜である、請求項6

に記載の方法。

【請求項 8】 支持体表面が二次元ゲルのレプリカであって、請求項 1 の方法の工程(iii)でそのまま用いられる、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】 混合物中のリガンドが、タグ剤と結合する抗タグ剤によって単離できるようにタグ剤で標識される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】 タグ剤がビオチンであって、抗タグ剤がアビジンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 アンチリガンドがタンパク質またはポリペプチドを含む、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】 アンチリガンドが抗体、または抗原と結合するその変異体もしくは誘導体である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 アンチリガンドが核酸である、請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】 少なくとも数個のリガンドおよび／またはアンチリガンドが未知である、請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】 実質的にすべてのリガンドおよび／またはアンチリガンドが未知である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】 アレイの一領域当たり 10 ないし 15 の異なるアンチリガンドが適用される、請求項 1 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】 アレイをサンプルに曝した際のリガンド／アンチリガンド結合における差異を検出することで、第1および第2の生体サンプル中の1以上のリガンドの有無および／または量を比較することを含む方法における、請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の方法によって得ることが可能なアレイの使用。

【請求項 18】 アレイを第1の生体サンプルに曝し、かつ、実質的に同等なアレイを第2の生体サンプルに曝した際のリガンド／アンチリガンド結合における差異を検出することで、第1および第2の生体サンプル中の1以上のリガンドの有無および／または量を比較することを含む方法における、請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載の方法によって得ることが可能な2以上の実質的に同等なアレイの使用。

【請求項 19】 第1および第2の生体サンプル中のリガンドが、異なる第1および第2の蛍光レポーターで標識されて、使用時、蛍光励起条件下でのアレイ検査下で、第1および第2の生体サンプルの1つに由来するリガンドと主として結合するアレイ中のアンチリガンドが第1または第2の蛍光放射を示し、さらに、第1および第2の生体サンプルに由来する実質的に同数のリガンドと結合するアンチリガンドが複合型の

蛍光放射を示すものである、請求項 17 または 18 に記載の使用。

【請求項 20】 第1および第2の生体サンプルが、アンチリガンドの、同等であるが別のアレイに適用される、請求項 17 または 18 に記載の使用。

【請求項 21】 アレイ作製方法の工程(ii)で準備されたりガンド混合物が第1または第2の生体サンプルと同じ供給源に由来する、請求項 17 ないし 21 のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 22】 第1の生体サンプルが罹患細胞種に由来し、第2の生体サンプルがその疾病には罹患していない対応する細胞種に由来する、請求項 17 ないし 21 のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 23】 好ましくは実施例 1 ないし 3 の1以上で示される、実質的に本明細書に記載の方法または使用。

## 詳細な説明

---

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は生物学的物質中のタンパク質を研究するための方法および材料に関するものである。特に、本発明は生物学的物質のサンプルのタンパク質発現の差異、特に罹患組織および正常組織サンプル間の差異の研究に役立つ方法および材料を提供することにある。

#### 【0002】

#### 【従来の技術】

ここ数年の間、特にゲノム科学、例えばヒトゲノム機構プロジェクト(HUGO)の発展により、治療的介入に向けた可能性ある標的として多数の構造の存在が確認されてきた。これらの種類の研究では、遺伝子配列および遺伝子構造に関する情報が明らかとなり、遺伝子産物の一次構造の推定が可能になった。しかしながら、遺伝子産物がもたらす何らかの機能を有しているものは完全遺伝子配列の50%よりもずっと少ない。

#### 【0003】

新規遺伝子および遺伝子産物の同定手段の必要性により、ハイスループットDNAおよびタンパク質配列決定技術が発展してきた。その結果、ゲノムまたはcDNAのいずれかのDNAを配列決定する速度が非常に上がり、現在のシステムは、20分間に500bpの速度で配列同定が可能となっている。さらに、DNA配

列決定の様々な態様をターゲットとした系もまた開発されてきた。用途によって、全長遺伝子配列情報が必要な場合もあるし、部分配列しか必要のない場合もある。特定の遺伝子の限定された変異(SNPのもの)の有無に関する情報は、問題の遺伝子に特異的なタグとして配列情報を用いることで、既知遺伝子が発現されるかどうかの情報とともに得られる。また、上記の方法により得られた莫大な量のデータの効率的な処理が可能となるバイオインフォマティクスシステムも開発された。

#### 【0004】

このように、この分野の技術の急速な発展により、研究者が微視的レベルではなく巨視的レベルで複合生物系を調べることが可能になり、現在では、最も巨視的な系で遺伝子発現、特に遺伝子発現の差異を分析している。しかしながら、遺伝子産物、タンパク質またはポリペプチドの巨視的分析に向けた系はあまり開発されていない。

#### 【0005】

遺伝子の発現様式の違いに関する情報は、例えば病理(罹患)組織と正常組織とを比較する際に重要である。アップまたはダウンレギュレートされる遺伝子が病理学的状態に関連しているという見解から、それらの産物またはこれらの産物と機能し得るように連結されたタンパク質のいずれかを治療的介入に向けた標的構造として使用することができる。最近では、数万個の遺伝子の分析が可能なDNAチップアレイに基づく技術が、遺伝子発現の特徴付けおよび示差的に発現された遺伝子の同定用に開発され、さらにそれが用いられて成功している(参考文献9、24および40参照)。この技術を用いて計画し得る試験は、異常組織および正常組織間の遺伝子発現の差異の研究に加えて、生物学的に活性な化合物による刺激後に細胞および組織に起こる事象に関する研究に関するものである。例えば、特定のリガンドによる刺激後に活性化されるシグナル伝達経路が確認でき、薬剤または薬剤候補による刺激後に遺伝子発現に与える影響が認められる。これらのおよび同様の手段が製薬およびバイオテクノロジー産業の大いなる関心を集めている。

#### 【0006】

しかしながら、それは遺伝子産物、すなわちタンパク質およびポリペプチドであり、細胞で機能を示す遺伝子自体ではない。よって、タンパク質が治療的介入に向けた主要な標的分子である。さらに、遺伝子活性、mRNAレベルおよび遺伝子によりコードされるタンパク質のレベル間には直接的な関係はない。mRNAおよびタンパク質のターンオーバーに影響を及ぼす因子によってmRNAおよびタンパク質レベル間の関係がすっかり消失してしまう。それゆえ、mRNAレベルが必ずしも細胞または組織の機能タンパク質のレベルを表しているわけではない(参考文献1、3および23参照)。さらに、タンパク質は、例えば

糖付加およびリン酸化により翻訳後修飾を受けていることが多い。かかる修飾はタンパク質の活性に大きな影響を及ぼすものである。特定タンパク質が修飾されているか否かは、mRNAまたはDNA配列からは識別することはできない。そのため、巨視的またはグローバルレベルでのタンパク質発現の研究を可能にし、さらに修飾型タンパク質を識別する方法の価値が大である。かかる方法ではプロテオーム、すなわち細胞のタンパク質の総体、またはメタボローム、すなわち代謝プロセスによって生じた分子の総体の同時分析が可能である。

#### 【0007】

タンパク質発現の研究方法には将来性のある利点があるにもかかわらず、タンパク質同定にはDNA同定よりもかなり多くの問題がある。特定のタンパク質の一次構造がわかっている場合でも、そのタンパク質とどんな分子が特異的結合をするのか、その結果としてタンパク質のプロープとしての役割を果たすのかということを推測することができない。これに対し、特定のDNA または遺伝子の配列が相補的および特異的オリゴヌクレオチドであるとわかっている場合、そのDNAは容易に作製できる。よって、DNAに基づくチップアレイを作製し、大きな問題もなく多数の遺伝子または遺伝子断片の同時検出に使用することができる。

#### 【0008】

タンパク質分析用チップアレイについてはすでに記載されている(参照文献7および10参照)が、それらの性能および使用はDNAアレイのものにかなり遅れをとっている。

#### 【0009】

現在において、タンパク質の巨視的または全体的分析に向けた最も一般的な方法は2Dゲル電気泳動に基づくものである(参照文献29および14参照)。この方法は長年使用されてきたものであるが、近年では全体的なレベルでの分析の必要性に応えられる系も開発されてきている(参照文献18参照)。さらに、多数のタンパク質が2Dゲル上の位置で同定できるようにデータ分析および処理技術もかなり向上してきている(参照文献18および32参照)。

#### 【0010】

2D-ゲルのスポットにあるタンパク質を同定するのに利用できる直接的な方法はない。同定されたスポットから溶出したタンパク質の質量分析により、タグとして使用できるペプチド配列決定が得られることもある。それが既知の配列と高い配列同一性、その特定スポットにあるタンパク質との同一らしさを示す場合、タグ配列を既知の配列、例えばデータベースと比較することができる。しかしながら、かかる系にはゲル電気泳動、画像解析、タンパク質スポットの溶出装置、質量分析計、データ処理およびバイ

オインフォマティクスの詳細な設定が必要である(参照文献30参照)。さらに、スポット間の量的な差異は、スポット密度から判定するにすぎず、さらにスポットがオーバーラップしているため、2Dゲルの結果もわかりにくい。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、2Dゲル分析の制限のいくつかを克服する方法および材料を提供することにある。本発明では生物系でのタンパク質の巨視的または包括的分析が可能となる。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明によれば、(i)複製可能なユニットの表面のリガンドとの結合に関して表示されるアンチリガンド分子のライブラリーを準備し、(ii)リガンドの混合物を準備し、(iii)ライブラリーを混合物に曝し、それにより、リガンド／アンチリガンド結合が生成することができ、(iv)リガンドと結合するアンチリガンドを単離してその数を増幅し、さらに(v)同じアンチリガンド、または複数の異なるアンチリガンドの調製物を基板の個別領域に適用して固相支持体上に個別のアンチリガンド含有領域のアレイを形成することを含む、選択されたアンチリガンドのアレイを作製する方法が提供される。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明のある実施形態では、その方法が工程(iii)と(iv)の間に複製可能なユニットの表面でアンチリガンドと結合したリガンドを単離するさらなる工程を含む。

【0014】

便宜には、混合物中のリガンドは、タグ剤と結合する抗タグ剤によって単離できるようにタグ剤で標識される。タグ剤は、好ましくはビオチンであって、抗タグ剤がアビジンである。しかしながら、本発明の方法での使用に種々の薬剤が利用可能であり、さらに好適であることは当業者には明らかであろう。

【0015】

リガンド混合物が、それがライブラリーに曝される前に1以上のパラメーター(サイズ、電荷または等電点)に基づいて分離されることが好ましい。好ましい分離方法は二次元ゲル電気泳動である。

【0016】

有利には、混合物中のリガンドが固定化される。

【0017】



有利には、分離された混合物中のリガンドがニトロセルロースまたはポリニフッ化ビニリデン(PVDF)膜のような支持体表面に固定化される。

#### 【0018】

分離されたリガンド混合物が、二次元ゲルのレプリカであって、そのレプリカが本発明の方法の工程(iii)でそのまま用いられる支持体表面に固定化されることが最も好ましい。ゲルレプリカをこのようにそのまま使用すると、ゲルレプリカから各リガンドバンドを個別に切除する関連方法に比べて、かなりの時間上及びコスト上の利点を有する。

#### 【0019】

アンチリガンドがタンパク質またはポリペプチドを含むことが好ましい。最も好ましくは、アンチリガンドが抗体、または抗原と結合するその変異体もしくは誘導体である。しかしながら、アンチリガンドが種々の供給源、特に抗体ライブラリー(参照文献4および26参照)、ペプチドライブラリー(参照文献36参照)、発現cDNAライブラリー(参照文献33参照)、アフィボディ(affibody)のような抗体構造とは別の足場のライブラリー(参照文献13参照)またはアプタマーに基づくライブラリー(参照文献21参照)などの分子ライブラリーから得られることは当業者には明らかであろう。

#### 【0020】

本発明の方法の特に有利な態様は、少なくとも数個の、好ましくはすべてのリガンドおよび／またはアンチリガンドが未知であることである。よって、リガンド、および／またはアンチリガンドの特性を事前に調べる必要はない。

#### 【0021】

本発明の方法の工程(vi)で複数の、特に10ないし15の異なるアンチリガンドを基板の各領域に適用してアンチリガンドアレイを形成することが最も好ましい。アレイの一領域当たりに複数のアンチリガンドを使用することで、アレイの一領域当たり単一アンチリガンドを使用する関連方法に比べて非常に多くの利点が得られる。

#### 【0022】

本発明の方法により得られるアレイには、アレイをサンプルに曝した際のリガンド／アンチリガンド結合における差異を検出することにより、第1および第2の生体サンプル中の1以上のリガンドの有無および／または量を比較することを含む本発明の第2の態様の方法における特別な有用性が認められる。

#### 【0023】

本発明のもう1つの実施形態は、アレイを第1の生体サンプルに曝し、かつ、実質的に同等なアレイを第2の生体サンプルに曝した際のリガンド／アンチリガンド結合における差異を検出することで、第1および第2の生体サンプル中の1以上のリガンドの有無および／または量を比較することを含む方法における、本発明の2以上のアレイの使用に関するものである。

#### 【0024】

本発明の第2の態様による使用では、使用時、蛍光励起条件下でのアレイ検査中に、第1および第2の生体サンプルの1つに由来するリガンドと主として結合するアレイ中のアンチリガンドが第1または第2の蛍光放射を示し、さらに、第1および第2の生体サンプルに由来する実質的に同数のリガンドと結合するアンチリガンドが複合型の蛍光放射を示すようにして、第1および第2の生体サンプル中のリガンドが、好ましくは異なる第1および第2の蛍光レポーターで検出可能なように標識される。

#### 【0025】

第1の生体サンプルが罹患細胞種に由来し、第2の生体サンプルがその疾病には罹患していない対応する細胞種に由来するか、または第1および第2のサンプルが各々休止および活性な同じ細胞種に由来する。このことから、タンパク質発現および代謝産物レベルの研究方法において本発明の使用が有用となる。

#### 【0026】

本発明の方法の工程(III)で準備されたリガンド混合物が第1または第2の生体サンプルと同じ供給源に由来してもよい。同じ供給源に由来するとは、例えば、混合物が同じ細胞種に由来していることを意味するものである。

#### 【0027】

蛍光標識以外の検出標識でリガンドおよびアンチリガンドを標識することは当業者には当然可能なことであり、かつ十分に可能である。いずれの検出標識の使用も本発明の範囲と考えられる。さらに、本発明は、例えばナノ電極(WO99/24823参照)またはバイオセンサー(参照文献25参照)を用いた導電率またはプラズモン共鳴の変化に基づく系などのリガンド／アンチリガンド結合を検出するためのその他の系もまた包含するものである。

#### 【0028】

第1および第2の生体サンプルが、アンチリガンドの、同一であるが個別のアレイに適用されてもよい。

#### 【0029】

定義「リガンド」とは、リガンド／アンチリガンド結合対の一方のメンバーを意味するものである。リガンドは、例えばハイブリダイズした相補核酸二本鎖結合対の一方の核酸鎖；エフェクター／受容体結合対の

エフェクター分子；または抗原/抗体もしくは抗原/抗体フラグメント結合対の抗原であってよい。

#### 【0030】

「アンチリガンド」とは、リガンド/アンチリガンド結合対のもう一方のメンバーを意味するものである。アンチリガンドは、例えばハイブリダイズした相補核酸二本鎖結合対のもう一方の核酸鎖；エフェクター/受容体結合対の受容体分子；または抗原/抗体もしくは抗原/抗体フラグメント結合対各々の抗体もしくは抗体フラグメント分子であってよい。

#### 【0031】

本明細書において使用される「検出可能なように標識された」とは、蛍光色素のような検出可能な物質に直接結合した抗原(リガンド)または抗体(アンチリガンド)、およびビオチン/ストレプトアビジンのような結合対のメンバーに結合した抗原(リガンド)または抗体(アンチリガンド)、または着色基質または蛍光の産生などによって検出できる分子と特異的に相互作用し得るエピトープタグを包含することが意図される。

#### 【0032】

「複製可能なユニット」とは、そのユニットが単独で、または1以上の薬剤の同時作用により複製し得ることを意味するものである。例えば、複製可能なユニットは宿主細胞を感染させ、自己複製し得るバクテリオファージであると考えられる。複製可能なユニットは宿主細胞では単独で複製できないが、ヘルパーファージの存在により複製できるファージミドであるとも考えられる。また、リボソームディスプレイユニットもは「複製可能なユニット」の範囲に入ることが意図される。

#### 【0033】

「固相支持体上の領域のアレイ」とは、固相支持体表面に形成された、各々が限定領域を有する、好ましくは独立した領域の直線または二次元アレイを意味するものである。典型的には、固相支持体はガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンである。固相支持体は、チューブ、ビーズ、ディスク、シリコンチップ、マイクロプレート、ポリニフッ化ビニリデン(PVDF)膜、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、その他の多孔質膜、非多孔質膜(例えば、特にプラスチック、ポリマー、パースペクス、シリコン)、複数の重合性ピン、もしくは複数のマイクロタイターウェルの形状、またはタンパク質を固定化および/または免疫学的検定を実施するのに好適ないずれか他の表面であってよい。結合工程は当技術分野では十分に周知であり、一般的には固相支持体との架橋共有結合またはタンパク質分子のそれに対する物理的吸着からなる。

#### 【0034】

「マイクロアレイ」とは、独立した領域の密度が少なくとも約 $100/\text{cm}^2$ 、好ましくは少なくとも約 $1000/\text{cm}^2$ の領域のアレイを意味するものである。マイクロアレイの領域は典型寸法、例えば約10ないし $250\mu\text{m}$ の範囲の直径を有し、アレイのその他の領域とはほぼ同じ間隔をおいて分けられている。

#### 【0035】

「細胞種」とは、所与の供給源、例えば組織もしくは器官由来の細胞、または所与の分化状態にある細胞、または遺伝子構造の所与の病状に関連する細胞を意味するものである。

#### 【0036】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマによって産生されるある免疫グロブリン分子とハイブリドーマが産生する1以上の免疫グロブリン分子の両方を、上記の免疫グロブリン分子の特異性が同じであるか否かの別なく、包含するものである。モノクローナル抗体は好適な遺伝子産物、エピトープ、ペプチドまたは遺伝子産物の断片、もしくはそれらの複数のものを含む混合物による免疫化で得ることができる。モノクローナル抗体は、組換えまたは天然供給源由来の、1以上のエピトープ、ペプチドまたはタンパク質断片に対して作製される天然のポリクローナル抗体から選択してもよい。

#### 【0037】

モノクローナル抗体を産生するために、タンパク質により免疫化した動物から抗体産生細胞(リンパ球)を採取し、標準細胞融合手法により骨髓腫細胞と融合させることで、これらの細胞を不死化して、ハイブリドーマ細胞を得ることができる。かかる技術は当技術分野では十分に周知なものである(例えば、DouillardおよびHoffman (1981). In: Compendium of Immunology Vol II (ed. Schwarz)参照)。例えば、最初にKohlerおよびMilstein (1975) Nature 256: 495-499により開発されたハイブリドーマ技術、ならびにヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら (1983) Immunol. Today 4: 72)、ヒトモノクローナル抗体を産生するEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら (1985) In: Monoclonal antibodies in cancer therapy, Alan R Bliss Inc., pp 77-96)、およびコンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニング(Huseら (1989) Science 246: 1275-1281)のようなその他の技術。ハイブリドーマ細胞は、そこから単離されたペプチドおよびモノクローナル抗体と特異的に反応する抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングすることができる。

#### 【0038】

「抗体変異体」とは、合成抗体、組換え抗体、または限定されるものではないが、免疫グロブリン軽な

らびに／または重鎖可変部および／もしくは不変部のファージディスプレイによって産生された1本鎖抗体分子または当業者には周知である免疫学的検定形式において抗原と結合し得るその他の免疫相互作用分子のような抗体ハイブリッドのいずれをも包含するものである。

#### 【0039】

ウイルス粒子のバクテリオファージの表面で発現されたファージディスプレイライブラリーにあるような免疫グロブリン軽ならびに重鎖可変部および不変部を含む組換え抗体が好ましい。コンビナトリアル抗体ライブラリー(Crosby WLおよびSchoor P. (1995) *Methods. Cell. Biol.* 50: 85; Winter J. (1994) *Drug Dev. Res.* 33: 71)のファージディスプレイによる高親和性抗体の最適化は伝統的および免疫化技術に代わる、天然抗体の多様性に関する免疫選択の強力な模倣である。ヒトFab、1本鎖抗体(de Kruif J, Boel EおよびLogtenberg T. (1995) *J. Mol. Biol.* 248: 97; Deng SJ, MacKenzie CR, Hiramata T, Brousseau RおよびLowary TL, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 4992; Zdanov A, Li Y, Bundle DR, Deng S. J.およびMacKenzie R (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 6423)またはジスルフィドにより安定化したFvのもの(Brinkman U, Chowdhury PS, Roscoe DMおよびPastan I. (1995) *J. Immunol. Methods*, 182: 41)は実質的には異質または自己いずれかの標的化抗原(Ditzel HJおよびBurton DR. (1995) In: *Vaccine 95: Molecular Approaches Control Infect. Dis. Annu. Meet.*, 12<sup>th</sup> (ed. RM Chanock), Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press. pp19 et seq.)、ハプテン(Short MK, Jeffrey PD, Kwong R-FおよびMargolies MN (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 28541)、炭水化物(Deng SJ, MacKenzie CR, Hiramata T, Brousseau RおよびLowary TL, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 4992; Zdanov A, Li Y, Bundle DR, Deng S. J.およびMacKenzie R (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91: 6423)、タンパク質、DNA(Barbas SM, Ditzel HJ, Salonen EM, Yang WPおよびSilverman GJ. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92: 2529)、またはRNA(Powers JE, Marchbank MTおよびDeutscher SL. (1995) *Symp. RNA Biology I. RNA-Protein Interactions*, In: *Nucleic Acids Symp. Series* 33, pp240)のいずれかに対する特異性により単離することができる。さらに、細胞サブ集団特異的モノクローナル抗体が合成ファージ抗体ライブラリー(de Kruif J, Boel EおよびLogtenberg T. (1995) *J. Mol. Biol.* 248: 97)由来のものであってもよい。ファージディスプレイライブラリーの組換え抗体の産生技術は当技術分野では周知のものである(Crosby WLおよびSchorr P (1995) *Methods. Cell. Biol.* 50: 85; Winter J. (1994) *Drug Dev. Res.* 33: 71)。

#### 【0040】

ファージディスプレイライブラリーの免疫グロブリン発現には、いくつかのバクテリオファージに基づ

くベクター系、例えば線状ファージ表面で免疫グロブリンFabフラグメント、軽および重鎖を発現するλImmunoZAP L、λImmunoZAP H、λImmunoZAP H/LおよびλSurfZAPをはじめとするλImmunoZAPベクター系が入手可能である(Hogrefe H. H., Mullinax R. L., Lovejoy A. E., Hay B. N.およびSorge J. A. (1993) Gene 128: 119-126; Mullinax R. L., Gross E. A., Amberg J. R., Hay B. N., Hogrefe H. H., Kubitz M. M., Greener A., Altling-Mees M., Ardourel D., Short J. M., Sorge J. A.およびShopes B.; (1990) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 87: 8095-8099., 1990; Shopes B. (1992) Third Annual IBC Int. Conf. Antibody Engineering 0: 121-131; Stratagene, CA., USA)。

#### 【0041】

「抗体誘導体」とは、当業者には周知である免疫学的検定形式において抗原と結合し得る、抗体フラグメント(Fabフラグメント)のような改変抗体分子、または抗体と別のペプチドもしくはポリペプチド、大型担体タンパク質または固相支持体(例えば、特にアミノ酸チロシン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システインおよびその誘導体、NH<sub>2</sub>-アセチル基またはCOOH末端アミド基)とを結合しやすくする1以上のアミノ酸または他の分子の付加により改変された抗体分子のいずれかをいうものである。

#### 【0042】

本発明の方法で使用される抗体分子、または抗体変異体もしくは誘導体は検出可能のように標識されることが好ましく、それと結合することでそれらの検出が容易になる1以上のレポーター分子の付加により改変されることが好ましい。

#### 【0043】

この実施形態によれば、抗原の標識混合物の1以上の抗原決定基を、特に蛍光標識、化学ルミネセンス標識、同位体標識、酵素標識などの種々の手段により検出することができる。

#### 【0044】

本明細書において使用される「検出可能のように標識された」とは、蛍光色素のような検出可能な物質に直接結合した抗原(リガンド)または抗体(アンチリガンド)、およびビオチン/ストレプトアビジンのような結合対のメンバーに結合した抗原(リガンド)または抗体(アンチリガンド)、または着色基質または蛍光の産生などによって検出できる分子と特異的に相互作用できるエピトープタグを包含することが意図される。

#### 【0045】

タンパク質を検出可能のように標識するのに好適な物質としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチル-ローダミン-5-(および6)-イソチオシアネート

(TRITC)、テキサスレッド、シアニン色素(例えば、Cy3およびCy5)、などのような蛍光色素;およびホースラディッシュペルオキシダーゼのような比色分析の基質と反応する酵素が挙げられる。蛍光色素の使用は、これらが極めて少量でも検出可能であるため、本発明の実施には一般に好ましい。

#### 【0046】

抗体との共有または非共有結合に好ましいレポーター分子としては、限定されるものではないが、放射性化学物質、ローダミンのような蛍光化合物、ピオチン、DIG、FLAGペプチド、ポリ-Hilもしくはポリ-Lysアミノ酸配列またはその他の既知のアミノ酸列のような免疫学上相互作用するペプチド、プロテインA、レクチン(例えば、フィトヘマグルチニンA)、第二抗体、およびアルカリ性ホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、大腸菌(*Escherichia coli*) $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素、ホタルルシフェラーゼタンパク質(Ow, D. W.: Wood, K. V.; DeLuca, M.; de Wet, L. R.; Helinski, D.R.; および Llowell, S. (1986) *Science* 234: 856-859; Thompsonら, 1991)および緑色蛍光タンパク質(Prasher, D. C.ら (1992) *Gene* 111: 229-233; Chalfie, M.ら (1994) *Science* 263: 802-805; Inouye, S.およびTsuji, F. I. (1994) *FEBS Letts* 341:227-280; Cormack, B.ら (1996) *Gene* (in press); Haas, J.ら (1996) *Curr. Biol.* 6: 315-324; GenBank受託番号U55762参照)のような機能性酵素が挙げられる。

#### 【0047】

免疫学上相互作用するペプチドまたは機能酵素を含むレポーター分子の場合、好ましくは、免疫グロブリンおよびレポーター分子部分の両方を含む融合タンパク質を産生することにより、組換え抗体と結合され、ここで、これらは上記の部分をコードする対応する遺伝子領域がインフレームで互いにスプライシングされ、組換え核酸分子が好適な細胞、ウイルスまたはバクテリオファージ発現系で発現される。かかる融合分子を得る技術は当技術分野では十分に周知のものである。

#### 【0048】

本発明の方法で使用される抗体ならびに／または抗体変異体および／もしくは誘導体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体供給源由来のものであってよい。例えば、免疫グロブリン可変軽および重鎖をコードするヌクレオチド配列はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を産生する場合のように、予め抗原により免疫化した動物由来のハイブリドーマまたはリンパ球から誘導したものであってよい。全細胞、組織、器官または全生物体または亜細胞性部分、またはその溶解物、抽出物もしくはその他の誘導体;ならびに／または細胞、組織、または生物体全体または一部、およびその溶解物に相当する生体サンプル由来のDNA;(すなわち、DNAワクチン);および／または二次元ゲル電気泳動のような分離手法に付した生体サンプル由来のタンパク質;および／または特徴的なアミノ酸配列を含む合成もしくは

は組換えペプチド;および/またはリガンド混合物を含む「スープ」による動物、特にウサギまたはマウスの免疫化をはじめとする従来の免疫化戦略を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体産生、または抗体誘導体産生を容易にしてもよい。

#### 【0049】

抗体ライブラリー(参照文献4および26参照)、ペプチドライブラリー(参照文献36参照)、発現cDNAライブラリー(参照文献33参照)、アフィボディのような抗体構造とは別の足場のライブラリー(参照文献13参照)またはアプタマーに基づくライブラリー(参照文献21参照)のような分子ライブラリーを、本発明の方法に使用するために多数のタンパク質、ポリペプチドまたは翻訳後修飾されたタンパク質もしくはポリペプチドに特異的なバインダー(アンチリガンド)またはプローブが好ましくは選択される供給源として用いてもよい。分子ライブラリーは原核生物(参照文献4および26参照)または真核生物(参照文献22参照)細胞においてin vivo発現されるが、細胞に関係なくin vitroでも発現される(参照文献15、16および28参照)。タンパク質に基づくライブラリーを使用する場合、可能性あるバインダー(アンチリガンド)のライブラリーをコードする遺伝子をウイルスにパッケージングし、可能性あるバインダー(アンチリガンド)をウイルス表面に表示する(参照文献4、26および36参照)。現在のところ、最も一般的に使用されるかかる系は、それらの表面で抗体フラグメントを表示し、その抗体フラグメントがバクテリオファージのマイナーコートタンパク質との融合物として発現される線状バクテリオファージである(参照文献4および26参照)。しかしながら、その他のウイルス(欧州特許EP39578)、細菌(参照文献13、5および6参照)および酵母(参照文献35参照)を用いて表示するその他の系もまた使用されている。さらに、最近では、いわゆるリボソームディスプレイ系でのポリペプチド産物とそのコーディングmRNAとの結合を利用するディスプレイ系(参照文献15、16および28参照)、またポリペプチド産物とそのコーディングDNAとの結合(米国特許第5,856,090号およびWO98/37186参照)についても提案されている。

#### 【0050】

ライブラリーから可能性あるバインダー(アンチリガンド)を選択する場合、1または数個の周囲のセクター(リガンド)分子を通常使用する。細胞結合抗原を使用する場合などの、精製されたセクター分子(リガンド)が使用できない場合でさえ、決められたセクター(リガンド)分子に対するバインダー(アンチリガンド)の特異性が確認できるように選択および分析を計画する。何千ものセクター分子(リガンド)を取り扱う場合には、セクター(リガンド)とその特異的なバインダー(アンチリガンド)間の関係の追跡を継続することは、何千ものリガンドに対して特異的なこれらのアンチリガンドを単に選択することと同様に、避けるべき問題である。しかしながら、アレイに整列されたスポットとの結合の分析に向けたア



レイ技術および系の使用によってこの問題を解消することができる。利用可能な技術により、その問題はいくぶん異なるであろう。

#### 【0051】

無限数のスポットをもたらし、さらに分析するために技術が利用可能な場合には、総ての可能性あるバインダー(アンチリガンド)、例えばライブラリーの抗体フラグメントをクローニングし、アレイ形式にスポットすることができる。次に、決められた供給源由来の抗原(リガンド)をアレイに結合させることが可能である。特定の抗原(リガンド)が結合する、特定の抗原(リガンド)に対するバインダー(アンチリガンド)および結合を含有することとなったスポットに読み取り可能なシグナルを与える。結合分析では、抗原(リガンド)の異なる調製物を同じアレイに付して得られたパターンと比較できるパターンが得られる。この2つの抗原(リガンド)調製物は、例えば病理および正常細胞または組織それぞれのものである。次いで、パターンの差異を2種の細胞または組織で示差的に発現された、または翻訳後修飾された抗原(リガンド)に対応させる。重要なことは、目的のスポットの情報がアレイのパターンおよびシグナルトポロジーの差異だけで得られることから、意義のある情報を得るのに、各々の、例えば抗体クローン(アンチリガンド)の同定および特異性に関する情報が事前に必要でないことである。必要なら、その後の工程でこれらのクローン(アンチリガンド)とそれらの対応する抗原(リガンド)を、例えば質量分析法により同定してもよい。今日、このアプローチを可能にする技術はまだない。そこで、代替法を開発し、ライブラリーサイズを小さくすることで有意なスポット数に減らす必要がある。

#### 【0052】

ライブラリーサイズを小さくする1つの方法は、目的の細胞または組織から得られた抗原(リガンド)に対し、選択を行うことである。しかしながら、上記のことと一致して、各クローン(アンチリガンド)の特異性、および選択に使用される抗原(リガンド)の同定に関する情報を取得する必要はない。例えば、抗体フラグメントに基づき、ライブラリーから単離されたバインダー(アンチリガンド)クローンをアレイにスポットし、次いで目的の組織由来の抗原(リガンド)をアレイに付す。結合により読み取り可能なトポロジーが得られた後、この位相パターンを第1の供給源と比較しようとするある供給源から得られた抗原(リガンド)によって得られるパターンと比較する。また、パターンの差異によって示差的に発現された抗原(リガンド)を含有するスポットがわかる。アレイのスポット数をさらに減らすため、限定数のライブラリークローン(アンチリガンド)を混合し、同じスポットに適用する。クローン(アンチリガンド)が同じ抗原(リガンド)と結合する必要はない。この理由はほとんどの抗原(リガンド)が異なる機能的状態にある細

胞間でさえ一定不変に保たれることにある。よって、示差的に発現されると思われる抗原(リガンド)部分はかなり少ない。そのため、各スポットに限定数のバインダー(アンチリガンド)が存在する場合でさえ、いずれかの単一スポットのバインダー(アンチリガンド)の特異性が2つの示差的に発現された抗原に向けられる危険性は低い。よって、示差的に発現された抗原(リガンド)がこのタイプのアレイによって検出される可能性は最も高い。

#### 【0053】

これらのタイプのアレイでは、スポットの位置は現実には重要でなく、結合抗原(リガンド)を同定するための情報は得られない。しかしながら、分子ライブラリーからのバインダー(アンチリガンド)選択に使用される抗原(リガンド)を事前にいずれかの手段によって分離した場合には、選択されたバインダー(アンチリガンド)が分離された抗原(リガンド)に対してスポットされ、スポット同定に関する情報が入手可能である。バインダー(アンチリガンド)選択を容易にするためにいずれかの分離手段を用いてもよいが、分離された抗原(リガンド)を同時に処理することが可能であるべきである。好適な分離手段は2-Dゲル電気泳動の使用である。分離後、抗原(リガンド)を膜、例えばニトロセルロースフィルターにブロットし、所望により復元してもよい。次いで、分子ライブラリーのメンバー(アンチリガンド)を分離された抗原と結合させることができる。次の工程で結合していないメンバーを洗浄除去し、結合したメンバー(アンチリガンド)を溶出して増幅する。結合したライブラリーメンバー(アンチリガンド)を必要であると考えられるいずれものサイクル回数で増幅した後、この手順を繰り返すことができる。最後に、特異的に結合したライブラリーメンバー(アンチリガンド)を含有する膜を規定の切片、例えば100×100に分割し、バインダー(アンチリガンド)を別々に増幅する。次いで、バインダー(アンチリガンド)をアレイにスポットする。従って、特定のスポットが、例えば2-Dゲル電気泳動により分離した後に特定の位置で認められる抗原(リガンド)に対するバインダー(アンチリガンド)を含有することになる。ここで、アレイ分析で光るスポットは、使用される分離方法により規定されたものと同定されることになる。この手順を用いることにより、各スポットには同じ抗原(リガンド)に対する数種類のバインダー(アンチリガンド)クローンが含まれると考えられる。各バインダーの親和性はさほど重要ではなく、抗原は数種類のクローンによって高い親和力で結合されることから、このことには検出および分析工程に重要な意味合いがある。よって、かかる事前分離を用いないアプローチに比べ、抗原の事前分離によるアプローチが好ましい。

#### 【0054】

種々の条件下で抗体:抗原複合体の形成を行い、多様な結合特性によって抗体を同定することができる。抗原含有反応溶液は種々の程度の塩を含有し、種々のpHレベルで処理することができる。さらに、結合

反応は種々の温度で行うことができる。条件設定のセットは、各々、抗原に対して異なる親和性を有する抗体を同定することになる。例えば、pH2で結合する抗体は胃で起こるような高酸性条件下で有用である。同様に、沸点近い温度で結合する抗体は好熱性生物の研究に有用である。一般に、pH条件は2ないし10(最も好ましくは約pH8)、温度は0℃ないし100℃、さらに塩条件は1  $\mu$ Mないし5M(NaClの場合)の範囲である。

#### 【0055】

親和性定数は特定のリガンドとその同起源のレポーターとの間の相互作用の尺度である。「結合親和性」、すなわち特定の抗体:抗原相互作用の間の結合の強さの尺度は、一般に抗体とその抗原の結合および解離配置の平衡濃度についての親和性定数により測定される。好ましくは抗原の結合は、約 $K_d=10^{-6}$ M以上の親和性で起こるのが本発明には有用であり、約 $10^{-7}$ Mを超えるとさらに好ましく、さらに最も好ましくは約 $10^{-8}$ Mないし約 $10^{-11}$ Mである。抗体フラグメントは一般に、約 $10^{-7}$ Mないし $10^{-8}$ Mの範囲の親和性を有する。

#### 【0056】

アレイスポットに結合した分子の解析は定量的、半定量的または定性的なものであり得る。ほとんどの分析は半定量的なものであり、それらの多くは標識リガンドによる読み出し装置に基づくものである。標識は多くの場合、蛍光体または放射性同位元素である。蛍光体はDNAアレイ(Affymetrix, Inc. CAから入手可能)での使用に都合がよく、多数のスポットの迅速な分析が可能である。ごく少数のスポットしかないタンパク質チップでは分析に質量分光器を使用するため(参照文献7参照)、その後、結合成分の同定に使用できる配列タグを得ることができる。質量分析法にはいずれの標識も必要ではないが、この技術は数多くのサンプルを用いる大型アレイの分析には、少なくとも今日では使用することができない。これに対し、蛍光性に基づく読み出し装置に加え、導電率またはプラズモン共鳴の変化に基づく新規に開発されたものでは、例えばナノ電極(WO99/24823参照)またはバイオセンサー技術(参照文献25参照)により、結合成分の分析に使用することができる。

#### 【0057】

本発明のもう1つの実施形態では、特徴付けされていない抗体のマイクロアレイを用いて細胞のタンパク質発現プロファイルを比較する。例えば、1の組織由来の細胞集団と第2の組織由来のもの、または特定の組織由来であるが異種由来の細胞とを比較することができる。正常細胞と罹患個体を供給源とする同一組織種由来の細胞とを比較することができる。例えば、正常細胞と癌細胞とを比較することができる。さらに、休止状態の細胞と活性化状態の細胞とを比較することができる。

#### 【0058】

別の例では、開示されたアレイが、例えば細菌、寄生物、ウイルス、等のような病原体によるタンパク質発現の評価に有用である。病原体により発現される総てのタンパク質を提示する病原体から作製した溶液(溶解液など)を使用して抗体アレイをタンパク質に接触させることができる。これらの抗体は診断薬、ならびに将来性のある治療薬として有用である。

#### 【0059】

本明細書に開示するマイクロアレイおよび方法を、特定疾患の診断方法に使用することができる。例えば、1以上の疾患に関連するある範囲の抗原に特異的な抗体コレクションをアレイし、その有無によって特定疾患徴候が示される抗原を含有する体液と接触させることができる。慣例的な免疫学的検定に対し、マイクロアレイを使用する利点は、種々の疾患の診断用の抗体集団を一方の表面に含めることができ、診断をなし遂げるのに必要な時間、経費および材料をかなり縮小できることである。

#### 【0060】

例えば、患者が1以上のタンパク質の有無に基づいて識別できるいくつかの性質の異なる疾患に特徴的な症状を示している場合、1回のマイクロアレイアッセイにより特殊な診断をし、その結果として患者を適切に治療することが可能である。

#### 【0061】

##### 【実施例】

以下、好ましい実施例を挙げて本発明のある態様を説明するが、これらに限定するものではない。

#### 【0062】

実施例1リガンドが同定されていない、またはアンチリガンドとリガンドとの関係が未知である、選択されたアンチリガンドのアレイアンチリガンドライブラリー 本実施例および以下の実施例では、可能性あるバインダー(アンチリガンド)は線状バクテリオファージマイナーコートタンパク質との融合物として表示される抗体フラグメントライブラリーのメンバーである(米国特許第5,969,108号および参考文献2および27参照)。ライブラリーは天然または免疫化動物もしくはヒトの抗体フラグメントに基づくものであってもよい(参考文献8、39および34参照)。また、これが合成遺伝子(参考文献17および12参照)、人工的に再配列した遺伝子(米国特許第5,969,108号)またはCDR-シャッフリング後に得られる抗体遺伝子(参考文献19参照)から作製された抗体フラグメントに基づくものであってもよい。

#### 【0063】

リガンド混合物 抗原複合混合物である、例えば腫瘍組織由来の選択された抗原(リガンド)調製物を固

相、例えばイムノチューブに固定化または検出可能に標識、例えばビオチニル化してもよい(参考文献27参照)。

#### 【0064】

リガンドのアンチリガンドへの暴露 次いで、ファージディスプレイ抗体のライブラリー調製物を抗原に曝し、抗原と結合させる。ビオチニル化抗原を用いる場合、抗原と結合したファージをアビジン被覆ビーズ(磁気を帯びていてもよい)を使用して回収する。次いで、結合していないファージを洗浄除去する。好適な洗浄条件については当業者には周知のことであろう(例えば、Ausbelら、Short Protocols in Molecular Biology、第3版、1995年参照)。

#### 【0065】

リガンドが結合した複製粒子の適用 結合したファージを標準技術により抗原から溶出し、線毛を発現する大腸菌(E.coli)に感染させ、結合しさらに溶出したファージ数を増大する(参考文献27参照)。ヘルパーファージ、例えばM13K07(参考文献27参照)またはR408(参考文献11参照)ファージで感染させた後、粒子を回収する。次いで、このファージ調製物を固定化抗原調製物に曝し、選択および増大サイクルを繰り返す。典型的には、標準技術による選択および増大2ないし4サイクルを用いる(参考文献27参照)。

#### 【0066】

選択されたアンチリガンドの単離 次の工程で、選択されたファージを大腸菌に感染させ、可溶性抗体フラグメントの産生ができるようクローニングする。これは非サブレッサー大腸菌株(参考文献26参照)感染後の抗体フラグメントおよびファージコートタンパク質間のアンバー終止の使用、またはファージディスプレイベクターから発現ベクターへの抗体フラグメントをコードする遺伝子の導入のいずれかによって行うことができる。次いで、ランダムクローンを選び取り、可溶性抗体フラグメントの産生できるように増大する。次いで、クローン由来の抗体の関連のない抗原に対する交差反応性を標準技術により確認してもよい(参考文献10参照)。

#### 【0067】

選択されたアンチリガンドアレイの作製および使用 次いで、抗体(アンチリガンド)を標準技術により1スポット当たり1クローンでアレイに適用する。また、生体サンプルのマイクロアレイ作製方法および装置については、その開示内容を参照により本明細書に組み入れるWO95/35505で記載されている。

#### 【0068】

マイクロアレイ作製方法は、ピン(パッシブピン、クイルピンなど)を用いる固相表面への印刷、または溶

液の個々の液滴をスポットする方法を含め、当技術分野では周知のことである。パッシブピンは、充分量のサンプルを取り込み、単一スポットを供給する。クイルピンは、充分量の液体を取り込み、複数のスポットを供給する。バブルプリンターはループを利用して少量を捕捉し、このループを通してロッドを押し出すことにより供給する。マイクロディスペンシングは、一定容量の複数のスポットを供給するためにシリンジ機構を利用する。さらに、固相支持体は、圧電(インクジェット)法を利用して配置することができ、この方法は、サンプルを固相支持体に能動的に運ぶ。

#### 【0069】

1つの方法が、ShalonおよびBrown(WO95/35505、1995年12月28日公開)で報告されているが、これは参照によりその全体を本明細書に組み入れる。ShalonおよびBrownで記載された方法および装置では、1スポット当たり0.01ないし100nlの容量を用いて、ガラススライド上に1平方センチメートル当たり600スポットまでのアレイを作製することができる。抗体の好適な濃度は、約1 ng/ $\mu$ lないし約1  $\mu$ g/ $\mu$ lの範囲である。

#### 【0070】

アレイを作製する他の方法は、写真平版印刷(Peaseら、PNAS 91(11): 5022-5026, 1994)およびin situ合成を含み、当技術分野では周知のことである。

#### 【0071】

マイクロアレイは、プラスチック(例えば、ポリカーボネート)、複合炭水化物(例えば、アガロースおよびセファロース)、アクリル樹脂(例えば、ポリアクリルアミドおよびラテックスビーズ)、およびニトロセルロースのような、種々の固相表面上に作製することができる。好ましい固相支持体物質としては、ガラススライド、シリコンウェファー、および正に荷電したナイロンが挙げられる。

#### 【0072】

固相支持体へ抗体を共有結合する方法は、当技術分野では周知のことである。かかる方法の例は、Bhatiaら、Anal. Biochem. 178(2): 408-413, 1989; Ahluwaliaら、Biosens. Bioelectron. 7(3): 207-214, 1992; Jonssonら、Biomaterials 17(22): 2199-2207, 1996に見い出されるが、これら全ては、参照によりその全体を本明細書に組み入れる。

#### 【0073】

固相表面への非特異的結合を減少させる方法は、当技術分野では十分に周知のことであり、ウシ血清アルブミン(BSA)、還元無脂肪乳、サケ精子DNA、ブタヘパリンなどを用いてアレイ固相支持体を洗浄する方法を含む(Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology、第3版、1995年参照)。

#### 【0074】

次いで、抗体フラグメントと結合するファージの選択に使用するタイプの抗原調製物をアレイに付すと、抗原がそれらに対応するアレイ上の抗体と結合する。

#### 【0075】

リガンド/アンチリガンド結合の検出 次いで、結合した抗原を、プラズモン共鳴、導電率、および抗原調製物を検出可能なように標識する場合には、蛍光または放射能を含む数多くの検出方法により検出することができる。有益なデータを得るため、正常対照物ないし腫瘍組織由来の別の抗原調製物を腫瘍組織に用いたものと同じアレイに付す。2組織間の異なるスポットが2組織で示差的に発現される抗原の現れであり、それゆえこれがさらなる分析に向けた目的の候補となる。

#### 【0076】

実施例2リガンドまたはアンチリガンドとリガンドとの関係が未知である、さらに1スポット当たり数種の未知のアンチリガンドクローンを含む選択されたアンチリガンドのアレイ 数種のランダムクローン由来の抗体フラグメントをプールし、同一スポットのアレイに適用することを除き、試験条件は実施例1と同じである。各スポットには、好ましくは10を超え50未満のクローンをプールする。このアプローチによって各スポットにただ1つのクローンを適用する場合よりもずっと多くの抗体クローンをアレイに適用することが可能になる。クローンは未知であるが、いずれかの所与のスポットのクローンが同じ抗原に向けられる可能性は低い。よって、数多くの抗原の発現差を検出するためには、いずれかの所与のスポットの比較分析が有望である。抗体クローン数を10ないし50間に維持した場合、いずれかの所与のスポットの異なる抗体が示差的に発現される2つ以上の抗原に向けられる可能性は低い。さらに、クローニングしたいずれかの抗体特異性が数個のプールに現れ、最終的にはアレイ上の数個のスポットとして現れる可能性があり、これによって情報の余剰性がいくぶんか生ずることになる。

#### 【0077】

実施例3リガンド分離後に得られるパターンに関してスポットされる、選択されたアンチリガンドのアレイ 抗原調製物の抗原(リガンド)は、例えばサイズ、電荷または等電点の差に基づき、例えばゲルろ過クロマトグラフィー(参照文献31参照)、キャピラリー電気泳動(参照文献20参照)、ゲル電気泳動もしくは等電点電気泳動または2Dゲル電気泳動の場合のようなこれらの組み合わせ(参照文献29および14参照)を利用して分離される。上記手法のいずれかにより抗原複合混合物を分離することで、固有のサイズ、等電点、電気泳動による移動度他についての抗原の同定に関連する情報が得られ、この情報の目的の抗原のさらなる同定における重要性は大である。よって、例えば腫瘍組織から得られた抗原調製物を、例えば

2Dゲル電気泳動を利用して分離する場合、ゲル上の抗原の位置がその同定に関し大きな意味を示す。実際には、2Dゲル上の数多くのスポットがさらなる分析法、例えば質量分析法によって同定された。

#### 【0078】

分離された抗原(リガンド)が、分離後に得られた形で、例えばファージディスプレイ抗体ライブラリー由来のアンチリガンドの選択に使用される場合、分離された抗原(リガンド)に特異的なアンチリガンドを得ることができる。かかる方法については例を挙げて以下に示す。

#### 【0079】

リガンド混合物のリガンドの分離 腫瘍組織から得られた抗原(リガンド)調製物を2Dゲル電気泳動により分離する。次いで、分離された抗原を互いに間隔をおいてニトロセルロースまたはPVD F膜のようなタンパク質結合膜にプロットする。よって、この膜がゲルのレプリカとなる。プロット後、膜に残った結合部位を標準技術によりブロックする(参照文献37および38参照)。

#### 【0080】

アンチリガンドライブラリーへの暴露 好ましくは、ゲルレプリカ上でのアンチリガンドと封鎖剤との結合を妨げる固定化リガンドと混合する前に、アンチリガンド調製物に封鎖剤を加える。次の工程で、ファージディスプレイ抗体フラグメントライブラリーを好適な量でゲルレプリカ膜に曝し、例えば緩やかな揺動または攪拌下で2時間インキュベートする。ファージディスプレイ抗体フラグメント(アンチリガンド)がゲルレプリカ膜に固定化されたそれらの対応する抗原(リガンド)と結合した後、結合していないファージを洗浄除去する。次いで、結合したファージを、例えば低pHまたはトリプシンを用いてゲルレプリカ膜から溶出する(米国特許第5,969,108号参照)。次いで、回収されたファージを大腸菌に感染させ、ファージミド系を用いる場合には、これらの細菌のヘルパーファージによる感染後に新しいファージ調製物を作製する(米国特許第5,969,108号参照)。ファージベクターを用いる場合にはヘルパーファージは必要ではない。次いで、得られたファージ調製物を、上記と同様にして得られた2Dゲルのレプリカである新しい膜での再選択に用いる。その後、上記の選択および増幅工程を2または3回繰り返す。最後の選択を行った後、ゲルレプリカ膜を区分し、結合したファージを各区分から個別に溶出する。

#### 【0081】

選択されたアンチリガンドの増幅 特定区分のゲルレプリカ膜に対応する、ファージの各調製物を個別に増幅し、可溶性抗体フラグメント(アンチリガンド)を各調製物から産生させる。

#### 【0082】

選択されたアンチリガンドアレイの作製および使用 次いで、2Dゲルでの位置に関して抗体調製物の起源



を見失わないようにしながら、各調製物の抗体をアレイにスポットして、同じアレイを同じ抗体フラグメント調製物から作製する。次いで、これらのアレイを用いて腫瘍組織および正常組織間の抗原(リガンド)発現の差異を分析する。このため、2組織由来の抗原調製物を同一条件下で作製し、各々同一アレイと結合させる。次いで、結合抗原を、例えばブラズモン共鳴または蛍光により(抗原を蛍光色素で標識した場合)分析する。シグナルパターンの違いによって2組織間の抗原発現差異が示され、異なるスポットのアレイの位置によって、2Dゲルに関連して抗原が同定される。

#### 【0083】

本発明の方法および材料の上記使用のいずれか1つにおいては、各スポットに適用された抗体の遺伝子情報が細菌で分かれる。それゆえ、特定のスポットを同定する場合には、スポットに結合する、特定の抗原またはタンパク質に対して特異的な試薬が容易に利用できる。これらの抗体は同定されたタンパク質のさらなる分析に使用することができる。問題の抗原が治療的介入に向けた標的としての可能性が示される場合、治療薬へと直ちに開発できる抗体をすでに得ている。

#### 【0084】

本発明の方法は、チップまたはアレイ技術に包括的に関連するタンパク質内容の変化を研究する方法を提供するものである。例えば、技術に基づく2Dゲル電気泳動と比べたかかるとの技術の利点は数多く、速度、感度、再現性および分析する識別領域またはスポット数の改善が挙げられる。このことを可能にするために本発明が解決する主要な問題は、アレイに基づく、原則として、数千の変異タンパク質またはポリペプチドの同定に使用できるかなり十分数のプローブをいかに得るかということである。さらに、プローブには、例えば示差的糖付加およびリン酸化により起こるタンパク質またはポリペプチドの翻訳後修飾変異体を識別することに可能性がある。本発明はこれらの問題を解決する方法および生体サンプルのタンパク質内容の包括的な分析を可能にする系を構築するための本発明の使用法について示している。

#### 【0085】

#### 【参考文献】

1. Aulak KS, Mishra R, Zhou L, Hyatt SL, de Jonge W, Lamers W, Snider M, Hatzoglou M (1999) *J Biol Chem* 274(43):30424-32
2. Barbas, C.F. 3d, Kang, A.S., Lerner, R.A. & Benkovic, S.J. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7978-7982
3. Charriere-Bertrand C and Nunez J, *Neurochem Int* (1992) 21(4):535-41
4. Clackson, T., Hoogenboom, H.R., Griffiths, A.D. & Winter, G. (1991) *Nature* 352, 624-628
5. Daugherty PS, Chen G, Olsen MJ, Iverson BL, Georgiou G (1998) *Protein Eng* 11(9):825-32
6. Daugherty PS, Olsen MJ, Iverson BL, Georgiou G (1999) *Protein Eng* 12(7):613-21
7. Davies, H Lomas, L and Austen, B. (1999) *Biotechniques* 27(6):1258-61
8. de Haard, H.J. et al. (1999) *J Biol Chem* 274, 18218-18230
9. de Saizieu A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W, Mous J (1998) *Nat Biotechnol* 16(1):45-8
10. Ekstrom S, Onnerfjord P, Nilsson J, Bengtsson M, Laurell T, Marko-Varga G (2000) *Anal Chem* 72(2):286-93
11. Engberg J, Andersen PS, Nielsen LK, Dziegiel M, Johansen LK, Albrechtsen B (1996) *Mol Biotechnol* 6(3):287-310
12. Griffiths, A.D. et al. (1994) *EMBO J* 13, 3245-3260
13. Gunneriusson E, Samuelson P, Ringdahl J, Gronlund H, Nygren PA, Stahl S (1999) *Appl Environ Microbiol* 65(9):4134-40
14. G6rg, A., Postel, W., Gunther, S., Weser, J. (1985) *Electrophoresis* 6,599-604

15. Hanes J, Pluckthun A (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94(10):4937-42
16. Iie M, Taussig MJ (1997) *Nucleic Acids Res* 1997 25(24):5132-4
17. Hoogenboom, H.R. & Winter, G. (1992) *J Mol Biol* 227, 381-388
18. Jensen ON, Wilm M, Shevchenko A, Mann M (1999) *Methods Mol Biol* 112:571-88
19. Jirholt, P., Ohlin, M., Borrebaeck, C.A.K. and Söderlind, E. (1998) *Gene* 215, 471-476
20. Jorgenson JW, Lukacs KD (1983) *Science* 1983 222(4621):266-72
21. Kenan DJ, Keene JD (1999) *Methods Mol Biol* 118, 217-31
22. Kieke MC, Shusta EV, Boder ET, Teyton L, Wittup KD, Kranz DM (1999) *Proc Natl Acad Sci U SA* 96(10):5651-6
23. Klingenspor M, Ebbinghaus C, Hulshorst G, Stohr S, Spiegelhalter F, Haas K, Heldmaier G (1996) *J Lipid Res* 37(8):1685-95
24. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL (1996) *Nat Biotechnol* 14(13):1675-80
25. Malmqvist M (1999) *Biochem Soc Trans* 27(2):335-40
26. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G (1991) *J Mol Biol* 222(3):581-97
27. McCafferty, J., and Johnson, KS. Construction and screening of Antibody display libraries. In *Phage Display of Peptides and Proteins: a Laboratory Manual*. (Eds. Kay, BK., Winter, J., and McCafferty, J.) Academic Press, San Diego, CA, (1996) pp79.
28. Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H (1997) *FEBS Lett* 414(2):405-8
29. O'Farrell, P.H. (1975) *J. Biol. Chem.* 250,4007-4021.

30. Perrot M, Sagliocco F, Mini T, Monribot C, Schneider U, Shevchenko A, Mann M, Jeno P, Boucherie H (1999) *Electrophoresis* 20(11):2280-98
31. Porath J, Flodin, P. (1959) *Nature* 193, 1657-1659
32. Reymond MA, Sanchez JC, Hughes GJ, Gunther K, Riese J, Tortola S, Peinado MA, Kirchner T, Hohenberger W, Hochstrasser DF, Kockerling F (1997) *Electrophoresis* 18(15):2842-8
33. Santi E, Capone S, Mennuni C, Lahm A, Tramontano A, Luzzago A, Nicosia A (2000) *J Mol Biol* 296(2):497-508
34. Sheets, M.D. et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 26, 6157-6162
35. Shusta EV, Kieke MC, Parke E, Kranz DM, Wittup KD (1999) *J Mol Biol* 292(5):949-56
36. Smith GP (1985) *Science* 228(4705):1315-7
37. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992) *Biotechnology* 24:145-9
38. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989) *J Clin Chem Clin Biochem* 27(8):495-501
39. Vaughan, T.J. et al. (1996) *Nat Biotechnol* 14, 309-314
40. Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ (1997) *Nat Biotechnol* 15(13):1359-67

The disclosure of the above references and other references mentioned above is incorporated herein.